

16.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 1 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 3 4 2 6 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 3 4 2 6 8]

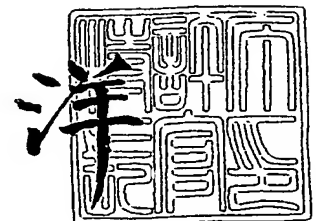
出 願 人 富 士 レ ビ オ 株 式 会 社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 7 6 1 7

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0840
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/12
G01N 33/53

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 内田 好昭

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 藤井 信之

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 倉野 義裕

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 岡田 政久

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 小垣 弘之

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 木戸 康仁

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 三宅 和重

【特許出願人】
【識別番号】 000237204
【氏名又は名称】 富士レビオ株式会社
【代表者】 鈴木 博正

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-373779
【出願日】 平成15年10月31日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 011556
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome ; SARS) 原因コロナウイルスの核タンパク質に対する抗 SARS ウイルスモノクローナル抗体。

【請求項 2】

配列表 1 で表される塩基配列を組み込んだベクターから発現させた前記コロナウイルスの核タンパク質を免疫原として作成されたハイブリドーマより産生される請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

寄託番号 FERM P-19572 のハイブリドーマ rSN-18、FERM P-19573 のハイブリドーマ rSN-122、FERM P-19574 のハイブリドーマ rSN-150、FERM P-19619 のハイブリドーマ rSN-21-2 又は FERM P-19620 のハイブリドーマ rSN-29 であるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体の結合特異性を有する請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

配列表 3 で表される前記 SARS ウイルスの核たんぱく質を免疫原として作成されたハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであって、抗 SARS ウイルスモノクローナル抗体産生細胞と腫瘍細胞とを細胞融合させることによって得られるハイブリドーマ。

【請求項 6】

請求項 5 記載のハイブリドーマであって、寄託番号 FERM P-19572 のハイブリドーマ rSN-18、FERM P-19573 のハイブリドーマ rSN-122、FERM P-19574 のハイブリドーマ rSN-150、FERM P-19619 のハイブリドーマ rSN-21-2 又は FERM P-19620 のハイブリドーマ rSN-29。

【請求項 7】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を固相抗体及び標識抗体の少なくとも一方に用いた SARS 原因コロナウイルスの免疫測定試薬。

【請求項 8】

輸液可能なマトリクス上に抗 SARS 抗体を固定した検出ゾーンと、標識抗 SARS 抗体を前記マトリクス上に移動可能に点着した標識試薬ゾーンとを有する SARS 原因コロナウイルスの免疫測定器具であって、前記検出ゾーンに固定した抗体及び標識抗 SARS 抗体の少なくとも一方が請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体である器具。

【請求項 9】

標識が酵素であり、マトリクスの酵素標識ゾーンの輸液方向の上流側に酵素と反応する基質を有する請求項 8 記載の免疫測定器具。

【書類名】明細書

【発明の名称】抗SARSウイルス抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ及び該抗体を用いる免疫測定試薬

【技術分野】**【0001】**

本発明は、重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome ; SARS) 原因コロナウイルス (以下SARSウイルスという) の核タンパク質に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、前記モノクローナル抗体を固相抗体及び／又は標識抗体として用いるSARSウイルスの免疫測定試薬又は免疫測定器具に関する。

【背景技術】**【0002】**

2002年から2003年にかけて、重症肺炎感染患者が世界各地で報告され、感染患者とともに多数の死亡者も報告された。患者から単離されたウイルスは、SARSウイルスと命名され、新型のコロナウイルスであることが確認された。このSARSウイルスの全遺伝子配列は、カナダ・プリティシュコロンビア州のマイケル・スミス・ゲノム科学センターによって解読されている (非特許文献1)。

SARS感染者は、ウイルスに感染して2日から7日の潜伏期間後、38度を超す高熱、咳、頭痛、呼吸困難などを引き起こし、一見、インフルエンザと症状が似ているため、早期にSARSウイルスによる感染か否かを判定することが求められている。SARSウイルスの感染の有無を診断する方法として、現在以下の方法が報告されている。

1) ELISAによる抗体測定法: SARS患者血清中の抗体 (IgM/IgA) を、臨床症状出現後約20日以降から検出できる。

2) 免疫蛍光抗体法: SARSウイルス感染VERO細胞を用いた免疫蛍光抗体法 (IgM検出)。発症後約10日後から血清中の抗体を検出できる。

3) PCR法: 血液、便、気道分泌物などの様々な検体からSARSウイルス遺伝子産物を増幅して検出する。

4) 細胞培養法: SARS患者検体 (気道分泌物、血液) 中のウイルスをVERO細胞などの培養細胞へ感染させて検出する。

【0003】

【非特許文献1】サイエンス (Science) ; 2003 May 30;300(5624):1394-9.

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

これまでのSARSウイルスの感染を確認する方法は、抗体検査法では感染後10日以降でなくては確認をすることができず、特に信頼性の高い蛍光抗体法は操作が煩雑であった。また、PCR法は、SARS関連遺伝子を単離して増幅する必要がある、特殊な増幅装置、測定装置を必要とし、簡便な測定法とはいえなかった。更に、細胞培養法は、一度に多数の検体を処理することが難しく、コロナウイルスへの感染の有無は判別できるが、SARSウイルスへの感染をこの方法だけで特定することはできなかった。

本発明の目的は、上記現状に鑑み、SARSウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供し、SARSウイルスを検出する該モノクローナル抗体を用いた免疫測定試薬又は免疫測定器具を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本願発明者らは、SARSウイルスに対して特異的で高い親和力を有する抗SARSウイルスモノクローナル抗体を得るべく努力した結果、PCR法を利用した合成ヌクレオチドにより得られたSARSウイルスの核タンパク質遺伝子から遺伝子組換え技術を用いて形質転換体を作成し、これから得たSARSウイルスの核タンパク質を免疫原として用いることによって、目的のモノクローナル抗体を得、更に、このモノクローナル抗体を用い

て免疫測定試薬を確立することができた。

【0006】

本発明のモノクローナル抗体は、SARSウイルスの核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体であり、配列表1で表される塩基配列を組み込んだベクターから発現させた前記コロナウイルスの核タンパク質を免疫原として作成されたハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体である。本発明は以下に示す寄託番号FERM P-19572のハイブリドーマrSN-18、FERM P-19573のハイブリドーマrSN-122、FERM P-19574のハイブリドーマrSN-150、FERM P-19619のハイブリドーマrSN-21-2、FERM P-19620のハイブリドーマrSN-29又はハイブリドーマSN5-25であるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体の結合特異性を有するモノクローナル抗体である。また、本発明は、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。本発明は、前記モノクローナル抗体を検体と反応させ、結合した免疫複合体を測定することによって、SARSウイルスの核タンパク質を測定する免疫測定試薬、及び輸液可能なマトリクス上に抗SARS抗体を固定した検出ゾーンと、標識抗SARS抗体を前記マトリクス上に移動可能に点着した標識試薬ゾーンとを有するSARS原因コロナウイルスの免疫測定器具であって、前記検出ゾーンに固定した抗体及び標識抗SARS抗体の少なくとも一方が前記記載のモノクローナル抗体である免疫測定器具である。

【発明の効果】

【0007】

本発明のモノクローナル抗体は、SARSウイルスの核タンパク質に対する特異性及び反応性が高いので、高感度なSARSウイルスの免疫測定法に利用することができる。また、本発明のハイブリドーマは、SARSウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することができる。更に、本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫測定試薬は、簡便な操作でSARSウイルスを含む検体又はSARS患者由来の検体のみを拾い落としなく検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下本発明を詳述する。本発明のモノクローナル抗体は、SARSウイルスの核タンパク質に対して特異的に反応する抗体（以下、「抗SARSウイルスモノクローナル抗体」ということもある）である。本発明のモノクローナル抗体を得るには、核タンパク質を免疫原として使用することができ、好ましくは核タンパク質を遺伝子組換え法、化学合成法に従い製造させて使用することもできる。この遺伝子組換え抗原としては、配列表の配列番号2のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドを使用することができる。また、化学合成された核タンパク質としては、例えば配列番号3に記載されたポリペプチドを用いることができる。

【0009】

本発明においては、上記配列表の配列番号2のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドを免疫原として用いることによって、SARSウイルスの核タンパク質に高い特異性を有するモノクローナル抗体を得ることができる。

【0010】

上記免疫原として用いるSARSウイルスの核タンパク質は、配列表の配列番号2のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドであればこのポリペプチドの前後に免疫原として影響を与えない範囲でペプチドが付加していてもよく、またSARSウイルスの核タンパク質の全領域であってもよい。また、更に必ずしも高純度に精製されたものでなくても、粗精製物であってもよい。なお、実質的に配列表の配列番号2のアミノ酸配列を含むとは、SARSウイルスの核タンパク質の機能又は立体構造に影響を及ぼさない範囲で、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列をも含むことを意味する。

【0011】

上記免疫原として用いるSARSウイルスの核タンパク質は、例えば遺伝子組換え技術

を用いた以下のような方法によって得ることができる。

SARSウイルスの核タンパク質をコードする遺伝子領域をPCR法によって増幅させ、制限酵素で切断することによって、上記配列表の配列番号2のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードする領域のDNA断片(配列表1)を得る。また、上記の塩基配列から、化学合成により、配列表の配列番号2又は3のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードする領域のDNA断片を得ることも可能である。こうして得たDNA断片を、アンピシリン耐性遺伝子等の適当な標識遺伝子を有するベクターに導入して得た組み換えDNAで、大腸菌等の宿主を形質転換し、形質転換体を得ることができる。この形質転換体を培養し、培養物を精製することによって上記SARSウイルスの核タンパク質を得ることができる。また、配列番号3で表される配列を含むようなポリペプチドであれば合成装置による公知の合成方法に従い核タンパク質を得ることもできる。

【0012】

上記抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、配列表の配列番号2又は3のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドを免疫原として用いて動物を免疫し、その抗SARSウイルスの核タンパク質抗体産生細胞と腫瘍細胞とを細胞融合することによって得られるハイブリドーマにより産生させることができる。

【0013】

上記ハイブリドーマは、以下の方法で得ることができる。即ち、上述のようにして得たSARSウイルスの核タンパク質をフロイントの完全アジュバンドとともに、数回に分けて、マウス等の動物に、2～3週間おきに、腹腔内又は静脈投与することによって免疫する。次いで、脾臓等に由来する抗体産生細胞と、骨髓腫ラインからの細胞(ミエローマ細胞)等の試験管内で増殖可能な腫瘍細胞とを融合させる。

【0014】

上記融合方法としては、ケーラーとミルシュタインの常法(ネーチャー(Nature)、256巻、495頁、1975年)に従ってポリエチレングリコールによって行うことができ、又は、センダイウイルス等によって行うこともできる。

【0015】

上記融合した細胞からSARSウイルスの核タンパク質を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択する方法としては、以下のようにして行うことができる。即ち、上記融合した細胞から、HAT培地中で、生存している細胞をハイブリドーマとして選択することができる。次いで、上記ハイブリドーマの培養培地を、高純度に精製したSARSウイルスの核タンパク質を固定化したアッセイプレート上で反応させた後、抗マウス免疫グロブリン(Ig)等と更に反応させるEIA法等によって、SARSウイルスの核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

【0016】

本発明のハイブリドーマとしては、SARSウイルスの核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであれば特に限定されないが、例えば、本発明者らが上述の方法によって樹立した6種のハイブリドーマが挙げられる。

【0017】

上記6種のハイブリドーマは、それぞれ、ハイブリドーマrSN-18、ハイブリドーマrSN-122、ハイブリドーマrSN-150、ハイブリドーマrSN-21-2、ハイブリドーマrSN-29及びハイブリドーマSN5-25と命名された。

【0018】

上記各ハイブリドーマは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター〔あて名;日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号〕に、ハイブリドーマrSN-18は、受託番号FERMP-19572(受託日;平成15年10月24日)、ハイブリドーマrSN-122は、受託番号FERMP-19573(受託日;平成15年10月24日)、ハイブリドーマrSN-150は、受託番号FERMP-19574(受託日;平成15年10月24日)、ハイブリドーマrSN-21-2は、受託番号FERMP-196

19 (受託日;平成15年12月26日)及びハイブリドーマrSN-29は、受託番号FERMP-19620 (受託日;平成15年12月26日)として寄託されている。

【0019】

上記各ハイブリドーマは、通常、細胞培養に用いられる培地において培養し、培養上清からモノクローナル抗体を回収することができる。また、ハイブリドーマが由来する動物に投与することによって、腹水を貯留させ、この腹水から回収することもできる。

【0020】

上記モノクローナル抗体の回収方法としては、通常行われている精製方法を用いることができ、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAによるアフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。

【0021】

上記のモノクローナル抗体は、通常の確認方法によってその反応性を確認できる。本発明の抗体としては、SARSウイルスの核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体である。

【0022】

本発明のSARSウイルスの免疫測定試薬は、上記モノクローナル抗体を固相抗体及び標識抗体の少なくとも一方に用いて検体中のSARSウイルス測定試薬を製造することができる。上記モノクローナル抗体を結合させる固相としては、従来免疫測定に用いられる各種固相であり、例えばELISAプレート、ラテックス、ゼラチン粒子、磁性粒子、ポリスチレン、ガラスなどの各種固相、ビーズ、輸液可能なマトリクス等の不溶性担体等を用いることができる。また、酵素、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子、発光物質、蛍光物質、放射性物質等によって標識し標識試薬を製造することができる。これらの試薬を組み合わせて、酵素免疫測定法、放射免疫測定法、蛍光免疫測定法等に用いる試薬を製造することができる。これらの測定試薬は、サンドイッチ法又は競合的結合測定法により、検体中の目的とする抗原を測定する試薬である。本発明のモノクローナル抗体を輸液可能なマトリクス上に固定した検出ゾーン、及び標識された本発明の抗SARSウイルスモノクローナル抗体を前記マトリクス上に移動可能に点着した標識試薬ゾーンを有するSARSウイルスの、イムノクロマトグラフィーを利用した、免疫測定器具を製造することもできる。

【0023】

上記サンドイッチ法による免疫測定の試薬としては、例えば、本発明のモノクローナル抗体を2種用意し、そのうち1種を前記標識物とし、他の1種を前記固相に結合させた試薬を製造することができる。まず、この固相試薬を測定すべき抗原を含む検体を反応させ、次いで結合した抗原に標識したモノクローナル抗体(第二抗体)を反応させ、不溶性担体に結合した標識物、即ち、標識モノクローナル抗体の量から測定すべき抗原の量を定量することにより、免疫測定を実施することができる。サンドイッチ法の免疫測定試薬では、1種類のモノクローナル抗体を固相抗体と標識抗体として用いることもできるが、通常測定すべき抗原の2つの異なるエピトープを認識する抗体を用いることが好ましく、固相抗体と標識抗体とをそれぞれ異なるモノクローナル抗体から選択して用いることが好ましい。更に、固相抗体と標識抗体のいずれについて、それぞれ2種以上のモノクローナル抗体から選択し組合せて用いることもできる。

【0024】

上記競合的結合測定法による免疫測定試薬としては、例えば酵素、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子、発光物質、蛍光物質、放射性物質等によって標識した一定量のウイルス抗原を作成する。この試薬を用いて、例えば、一定量の本発明のモノクローナル抗体、前記標識したウイルス抗原及び測定すべき抗原を含む検体とを競合的に反応させ、抗体と結合した、又は、結合しなかった標識抗原の量から測定すべき抗原の量を定量することにより免疫測定を実施することができる。抗体と結合した標識抗原を結合しなかったものと分離するためには、抗体と同種の免疫グロブリンを加え、これに対する抗体を加えて、抗体と結合した標識抗原を沈殿させ分離し、測定する二抗体法、チャーコール、ミリポア

フィルターを用いる方法等によって行うことができる。

【0025】

本発明において、前記抗体又は抗原を固相又は標識物と結合させるには、物理吸着法、化学結合法等の方法に従い標識抗体又は標識抗原を作成することができる（蛋白質 核酸 酵素 別冊No.31, 37～45 (1987年)参照）。

【0026】

また、本発明の抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、イムノクロマトグラフィーを利用した免疫測定器具に用いると、検体中のSARSウイルスを特別な測定装置を用いることなく、簡便に検出することができる。この測定器具としては、不溶性担体として毛細管作用により輸液可能な帯状のマトリクスを備え、該マトリクスに、少なくとも1種類の抗SARSウイルスモノクローナル抗体を不動化したSARSウイルス検出ゾーンと、標識された抗SARSウイルスモノクローナル抗体を移動可能に点着した標識試薬ゾーンと、検体点着ゾーンと、前記マトリクスの一方の長手方向の展開液パッドを付設した展開液供給ゾーンと、前記マトリクスの長手方向の他の端部に設けた展開液吸収ゾーンとを有するSARSウイルス免疫測定器具である。

【0027】

この免疫測定器具におけるマトリクスは、帯状の毛細管作用によって液体を輸液可能な吸収性の材料で構成される。この吸収性材料としては、例えばセルロース、ニトロセルロース等のセルロース又はその誘導体、ガラス繊維等を単独又は混合して製造したろ紙、膜、多孔性材料である。このマトリクスの大きさに制限はないが、幅3mm～10mm程度、長さ30mm～100mm程度のストリップ状のものが取り扱いが容易で好ましい。マトリクスの厚さは100μm～1mmのものを用いることができる。またマトリクスは、その一部又は全体を測定時に検体由来のタンパク質のマトリクスへの非特異反応による吸着を防止するために、例えば牛血清アルブミン(BSA)等の動物血清、カゼイン、シュークロース等でブロックングして用いることができる。

【0028】

(検出ゾーン)

検出ゾーンには、前記マトリクス上に抗SARSウイルスモノクローナル抗体を不動化したSARSウイルス検出部を設けることができる。この検出部に不動化する抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、後述する標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体とともに、少なくとも一方が本発明の抗SARSウイルスモノクローナル抗体であり、両方の抗体が抗SARSウイルスモノクローナル抗体であることが好ましい。検出部の前記抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、マトリクス上にあり、マトリクスを展開する液体の輸液方向(マトリクスの長手方向)に直交する方向にライン状に設けることが感度よく測定するためには好ましい。

【0029】

この検出ゾーンの抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、前記した抗体であり、モノクローナル抗体を単独又は混合して用いることもできる。抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、IgG抗体、IgM抗体、更にこれらの抗体のフラグメントであるFab、Fab'、F(ab')₂等であってもよい。

【0030】

検出部に不動化される抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、直接マトリクスの検出ゾーンに物理吸着させてもよいが、共有結合などの化学結合によって固定することによって設けることもできる。また、抗SARSウイルスモノクローナル抗体を水不溶性の担体に結合させ、これをマトリクス内に含有させてもよい。この不溶性の担体としては、ゼラチン、アラビアゴム及びヘキサメタリン酸ナトリウムからなる混合物を不溶化して得られる粒子(特公昭63-29223)、ポリスチレンラテックス粒子、ガラス繊維等を挙げることができる。不溶性の担体と抗SARSウイルスモノクローナル抗体と結合させるには、前記化学結合又は物理吸着により結合させることができる。

【0031】

この検出部は、マトリクスの輸液方向において、標識試薬ゾーン、検体点着ゾーン及び展開液供給ゾーンの下流側であって、添加液吸収ゾーンの上流側である。検出部は、マトリクスに巾0.5mmから5mm程度のライン状に近接して複数のラインを設けることができる。巾5mm程度のマトリクスであれば、前記抗体及び抗原を通常それぞれ0.1μgから10μg程度点着し、乾燥させることにより検出部を作成することができる。

【0032】

(標識試薬ゾーン)

標識試薬ゾーンは、マトリクス上に設けられたゾーンに標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体を移動可能に点着して設けることができる。このゾーンは展開液供給ゾーンからの展開液の輸液方向で前記検出ゾーンの上流側に設けることができる。このゾーンは、マトリクスに標識試薬を点着する方法、標識試薬を含む吸水性のパッドをマトリクス上に積層する方法、又はパッドと密着するマトリクス部分の一部又は全部にパッドとともに標識試薬を含有させることにより構成される。吸水性のパッドとしては、後述する検体点着ゾーンのパッドを用いることができる。

【0033】

標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体としては、前記検出ゾーンに設けられる抗体とともに、少なくとも一方が抗SARSウイルスモノクローナル抗体であり、更に両方の抗体が抗SARSウイルスモノクローナル抗体であることが好ましい。標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体としては、前記検出ゾーンの抗体と同様にそのフラグメントを用いることもできる。

【0034】

前記標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、前記抗体と標識物とを結合させて製造することができる。標識物としては、酵素、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子、蛍光ラテックス粒子、発光物質、蛍光物質などを挙げることができる。酵素としては酵素免疫測定法(EIA)に用いられる各種酵素であり、その酵素としては例えばアルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、β-D-ガラクトシダーゼ等を挙げることができる。また、金属コロイド粒子としては、例えば金コロイド粒子、セレンコロイド粒子などを用いることができる。

【0035】

また、標識物と抗SARSウイルスモノクローナル抗体との結合方法は、公知の共有結合又は非共有結合を作る方法を利用して製造することができる。結合の方法には、例えばグタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、ピリジル・ジスルフィド法、各種架橋剤を用いる方法等を挙げることができる(例えば「蛋白質核酸酵素」別冊31号、37~45頁(1985)参照)。架橋剤を用いる結合方法では、架橋剤としては例えばN-スクシンイミジル-4-マレイミド酪酸(GMBS)、N-スクシンイミジル-6-マレイミドヘキサン酸、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸等を用いることができる。共有結合による方法では、抗体に存在する官能基を用いることができる他、例えばチオール基、アミノ基、カルボキシル基、水酸基等の官能基を常法により導入したのち、前記結合法により標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体を製造することができる。また非共有結合による方法としては物理吸着法等を挙げることができる。

【0036】

標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体量は、通常検査対象物の予測される量に応じて適宜変更することができるが、通常乾燥重量で0.01μg~5μg程度である。標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体は、試薬の安定化剤、溶解調節剤等とともに塗布することができる。

【0037】

(検体点着ゾーン)

検体点着ゾーンは、展開液供給ゾーンの展開液の輸液方向の下流側で検出ゾーンの上流側のマトリクスに特に試薬等を含まずに設けることができる。さらに検体点着ゾーンは、

1) 展開液ゾーンの展開液輸液方向の下流側で標識試薬ゾーンの上流側の所定箇所、2) 標識試薬ゾーンの下流側で検出ゾーンの上流側の所定箇所、3) 標識試薬ゾーン上の所定箇所等に設けることができる。また、前記標識試薬ゾーンに検体点着ゾーンを設けた装置では、前記した如く標識試薬を含有する吸水性パッドを付設することが効率よく分析を行う上で好ましい。このパッドを付加する装置では、多量の検体液を点着することができるため、検体中の微量成分を検出感度よく測定を行うことができる。この吸水性のパッドとしては、標識試薬や検体中のSARSウイルスを吸着することの少ない材料から選択され、例えばポリビニルアルコール(PVA)、不織布、セルロース等の多孔質の合成又は天然の高分子化合物からなる材料を単独又は組み合わせで構成することができる。このパッドの大きさ、厚さ、密度等は限定されないが、通常縦と横が3 mm~10 mm程度で、厚さが0.5 mm~4 mm程度のパッドを用いることが効率よく測定を行うためには好ましい。

【 0 0 3 8 】

(展開液供給ゾーン)

(展開液供給ゾーン)
展開液供給ゾーンは、マトリクスの手方向の一端に設けられ展開液が供給されるゾーンである。測定を開始するには、このゾーンを少なくとも展開液吸収ゾーンに達する量の展開液の入った容器に浸し行うことができる。さらに展開液の供給には展開液ゾーンに展開液の入った液槽を付加し、この液槽のカバーを破り展開液とマトリクスを接触させることにより測定を開始することもできる。展開液には、界面活性剤、緩衝剤、安定化剤、抗菌剤等を適宜含有することができる。また、標識物として酵素も用いる場合には、後述する基質ゾーンとともに展開液に基質を添加することもできる。緩衝剤を含む緩衝液としては、例えば酢酸緩衝液、ほう酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、ジエタノールアミン緩衝液等を挙げることができる。また展開液供給ゾーンには展開液のマトリクスへの供給を安定して連続的に実施するため展開液パッドを付設することができる。展開液パッドとしては、例えばセルロース又はセルロース誘導体等のろ紙を用いることができる。

【 0 0 3 9 】

(展開液吸収ゾーン)

(展開液吸収ゾーン)
展開液吸収ゾーンは、マトリクス的一端に設けられた前記展開液ゾーンに対して他端に設置される。このゾーンはマトリクスに供給される展開液を吸収し分析を円滑に行うために設けられる。展開液吸収ゾーンはマトリクスを長く形成してこのゾーンを確保することもできる。また、マトリクスに吸水性材料を付設し展開を促進することもできる。この吸水性材料には、天然高分子化合物、合成高分子化合物等からなる保水性の高いろ紙、スポンジ等を用いることができる。展開液吸収ゾーンは、展開液を全て吸収する容積をもったパッド状の吸収性材料があるが、吸収性材料をマトリクスの上又は下に積層することにより、小型化した免疫測定器具を製造することができる。

【0 0 4 0】

(基質試薬ゾーン)

更に、標識試薬ゾーンの標識物として酵素を用いる場合には、前記した通り展開液に基質を含有させるか、基質試薬ゾーンをマトリクスの前記展開液供給ゾーン近傍に設けることができる。基質試薬ゾーンは、展開液供給ゾーンに付設した前記展開液パッドに含有させ設けることが基質量を多くして高感度測定を行う上で好ましい。

【0 0 4 1】

【0041】
基質としては標識試薬の酵素に対応して以下に示す各種発色基質、蛍光基質、発光基質等を用いることができる。

【0042】

【0042】
(a) 発色基質パーオキシダーゼ用：過酸化水素と組合せた2, 2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン (TMB)、ジアミノベンチジン (DAB)
アルカリホスファターゼ用：5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP)、p-ニトロフェニルホスフェート (p-NPP)、5-ブromo-4-クロロ-3-イ

ンドリルリン酸ナトリウム (BCIP・Na)

(b) 蛍光基質アルカリホスファターゼ用: 4-メチルウムベリフェニル-ホスフェート (4MUP)

β -D-ガラクトシダーゼ用: 4-メチルウムベリフェニル- β -D-ガラクトシド (4MUG)

(c) 発光基質アルカリホスファターゼ用: 3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスフォルルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン・2ナトリウム塩 (AMPPD)

β -D-ガラクトシダーゼ用: 3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''- β -D-ガラクトピラノシル)フェニル-1, 2-ジオキセタン (AMGPD)

パーオキシダーゼ用: 過酸化水素と組み合わせたルミノール、イソルミノール

【0043】

前記基質を基質ゾーンとして設ける場合には、通常前記基質を水溶液に溶解して展開液パッドにライン状に塗布した後、乾燥させることにより形成することができ、所望により基質のシグナル増強剤、安定化剤、溶解調節剤等を添加することもできる。基質ゾーンは、マトリクスの端部に付設した展開液パッド内であれば、特に限定されない。展開液及び展開液パッドに添加する基質量は、測定条件により決定することができるが、1個の器具当たり通常5～500 μ g程度を用いることができる。

【0044】

(測定試薬の使用方法)

本発明の測定試薬により各種検体試料中のSARSウイルスの測定を行うことができる。測定は、まず検体を本発明の測定器具の検体点着ゾーンに供給した後、展開液を展開液パッドに供給し、マトリクスに展開して行う。展開液は毛細管作用によりマトリクスを移動し、展開液吸収ゾーンに達し、検出ゾーンに結合されなかった検体中の成分、酵素標識試薬等が吸収され展開が完了する。所定時間(通常10分から20分)経過後、検出ゾーンを観察し、検体液中のSARSウイルスにより検出部に固定化された標識物を測定することにより、SARSウイルスの測定を行うことができる。この検出は標識物又は標識物と用いる酵素とによりそれぞれ対応する目視又は比色計、蛍光光度計、フォトンカウンター、感光フィルム等の測定装置を用いて実施することができる。測定では、例えば検出ゾーンの発色を目視で測定する方法が簡便である。また、この方法ではSARSウイルスの濃度に対応した色票(カラーチャート)を用いることにより半定量的な分析が可能となる。更に、比色計等により検出ゾーンの発色を数値化して、定量を行うこともできる。

【0045】

また、前記マトリクスはプラスチック、金属、紙等の支持部材上に積層し固定して用いることもできる。更に前記マトリクスは、プラスチック等のケースに固定し、展開液を含む液槽を展開液供給ゾーンに付設し前記各ゾーン部分に穴の開いたケースでカバーをすることにより取扱の容易な器具を構成することができる。

【0046】

上記試薬によって測定できる検体としては、SARSウイルスの核タンパク質を含むものであれば特に限定されず、例えば、ヒト又は動物由来の血液由来の血清、血漿、全血の他、鼻腔ぬぐい液(鼻腔スワブ)、鼻腔吸引液、咽頭ぬぐい液(咽頭スワブ)等の体液抽出液、気道分泌物、細胞又は組織ホモジネート液等を挙げることができる。これらの検体は、SARSウイルスを含む溶液をそのまま検体として用いることもできるが、界面活性剤、例えば非イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤等を用いてウイルスを処理をした溶液を用いることもできる。非イオン界面活性剤としては、例えばノニデット(ノニデットT-40)、トライトン、Brj等、陰イオン界面活性剤としては、例えばSDS等が用いられる。

【0047】

また、ヒト又は動物由来の種々の細胞、組織等を固定化し、本発明のモノクローナル抗体を反応させることによって、細胞、組織等に分布するSARSウイルスの核タンパク質

を直接測定することも可能である。更に、本発明のモノクローナル抗体を用いて、いわゆるウェスタンブロットティング、アフィニティクロマトグラフィー等を行うこともできる。

【0048】

本発明のモノクローナル抗体を用いたSARSウイルスの核タンパク質の測定方法を、ヒト又は動物由来の種々の検体に適用することにより、SARSウイルス感染の診断を実施することができる。本発明のモノクローナル抗体を用いることによって、免疫化学的方法や免疫組織化学的方法により、ヒト又は動物由来の種々の体液、細胞、組織等におけるSARSウイルスの核タンパク質を直接測定することが可能となる。SARSウイルスは、哺乳動物、鳥類などからヒトへ感染したルートが疑われており、通常のヒト検体のほか、動物検体の測定によって、感染ルートの解明にも用いることができる。

【実施例】

【0049】

以下、本発明を参考例及び実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0050】

参考例1 プラスミドの作製

核タンパク質遺伝子(Nとする)は全長1270塩基対で構成されている。既に報告された遺伝子配列より、15塩基の重なりを有する50~55塩基のオリゴマーを作製し、N遺伝子のほぼ真中を水解する制限酵素NheIの前後で2つの断片に分けてPCRにて順次増幅した。前半部分は最後のプライマーの5'側にEcoRI部位を、後半部分の3'側にBamHI部位を付加してPCRを行った。

これらの断片をQIAGEN社のPCR Purification Kitで精製し、前半部はEcoRIおよびNheI、後半部はNheIおよびBamHIで水解し、図1に示す発現用プラスミドpW6AのEcoRI-BamHI部位に挿入し、プラスミドpWS-Nを作製した。これを用い大腸菌BL21(DE3) (Brookhaven National Laboratoryより入手)を形質転換させ、アンピシリン耐性の形質転換体大腸菌BL21(DE3)/pWS-Nを得た。核タンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列を配列表1及び2に示す。

【0051】

参考例2 組換えタンパク質(S-N)の発現

参考例1で作製した形質転換体を、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地2ml中37℃で培養した。予備培養にて600nmでODを0.6~0.8にした後0.4mM IPTGを添加し発現誘導を行い、更に3時間培養した。1.5ml量の菌体培養液を5000rpmで2分間遠心分離して菌体を集め、100 μ lの緩衝液(10mMトリス-塩酸、pH8.0、0.1M塩化ナトリウム、1mMEDTA)に懸濁し、15分間の超音波破碎により完全に菌体を破碎した。これを菌体試料とした。

菌体試料8 μ lに3倍濃度のSDSポリアクリルアミド緩衝液(0.15Mトリス-塩酸、pH6.8、6% SDS、24%グリセロール、6mM EDTA、2% 2-メルカプトエタノール、0.03% プロモフェノールブルー)4 μ lを加え十分攪拌した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ニトロセルロースフィルターにウェスタンブロットを行って転写を行い、1%BSAによりブロッキング後、リン酸緩衝液(10mMリン酸、pH7.4、0.15M塩化ナトリウム)で1000倍に希釈したモノクローナル抗体N5を反応させた。更に、ペルオキシダーゼ酵素標識された抗マウスIgウサギポリクローナル抗体(ダコ社製)を反応させ、洗浄後10mlの基質発色液(0.01%過酸化水素水、0.6mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール)を添加し発色させた。結果を図2に示す。

【0052】

参考例3 可溶性S-Nの精製

参考例1で作製した大腸菌BL21(DE3)/pWS-Nをアンピシリンを含むLB培地37℃条件下で培養した。予備培養にて600nmでOD約0.7の濃度にしたのち、0.4mM IPTGを添加し発現誘導を行った。18時間培養後遠心操作を行い、大腸菌を回収した。回収した大腸菌に20mMトリス-塩酸 pH8.0、1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。遠心後、可溶性画分S-Nに硫酸アンモニウムを加え20~40%画分

を回収した。この硫酸アンモニウム画分を、0.1M 塩化ナトリウム、8M 尿素、20mM リン酸緩衝液 pH6.9で平衡化したSP セファロース ファースト フロー（アマシャム社製）にアプライし、0.2M 塩化ナトリウム、8M 尿素、20mM リン酸緩衝液 pH6.9で溶出し精製した。溶出画分を0.2M塩化ナトリウム、20mMトリス塩酸緩衝液 pH8.0で透析を行った。参考例2と同様にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウェスタンブロットを行い、精製度を確認した。その結果では単一のバンドを示した。

【0053】

実施例1 抗Nタンパク質モノクローナル抗体の確立

抗Nタンパク質に対するモノクローナル抗体は、参考例3で作製したリコンビナントNタンパク質をマウスに免疫し、その脾臓リンパ球とミエローマ細胞を融合することにより作製した。すなわち、BALB/Cマウスをフロイント完全アジュバントでエマルジョン化したリコンビナントNタンパク質を50~100 μ g/マウスで初回免疫を行い、2~3週間後、フロイント不完全アジュバントでエマルジョン化した同抗原 50~100 μ g/マウスで追加免疫を行った。抗体価のチェックは、リコンビナントNタンパク質をコートした96Well ELISAプレートを用いた固相ELISAで行った。抗体価の上昇が認められたマウスにFreeのリコンビナントNタンパク質25~100 μ gを静脈内投与し、その3~4日後、マウスから脾臓を取り出し脾細胞を調製した。前もってRPMI-1640培地で培養していたマウスミエローマ細胞(P3U1)と脾細胞を1:2~1:5の比率で混合し、PEG（ペーリンガー社製）を用い細胞融合を行った。融合した細胞はHAT培地に浮遊した後、96Well培養プレートに分注し37℃ CO₂インキュベーターで培養した。

【0054】

スクリーニングは上記に示した固相ELISAで行った。すなわち、リコンビナントNタンパク質を96Well ELISAプレート（ファルマシア社製）に1 μ g/mlの濃度で50 μ l/Well分注し、4℃ 一晚放置することにより吸着させた。1%スキムミルクでブロッキングした後、洗浄緩衝液（0.05% Tween20を含むPBS）で3回洗浄し、細胞融合を行ったプレートの培養上清50 μ lを加え、37℃1時間反応させた。同様に洗浄緩衝液で3回洗浄後、POD標識抗マウスイムノグロブリン抗体（DACO社製）を加え、さらに37℃1時間反応させた。洗浄緩衝液で4回洗浄後、基質ABTSを加え発色の見られるWellを選択した。次に、選択したWellの細胞を24Well 培養プレートに移し37℃ CO₂インキュベーター中で培養した後、限外希釈法にてSingle Cloneとし、以下に示す抗Nタンパク質モノクローナル抗体体を産生する5種類のハイブリドーマrSN-18、rSN-122、rSN-150、rSN-21-2及びrSN-29を確立した。これらのハイブリドーマは、前記特許生物寄託センターに寄託され、その寄託番号はそれぞれFERM P-19572、FERM P-19573、FERM P-19574、受託番号FERMP-19619及びFERM P-19620である。

【0055】

実施例2 ウェスタンブロッティング（WB）法によるモノクローナル抗体の反応性の確認

確立した各モノクローナル抗体のNative抗原（ウイルス由来のNタンパク質）に対する反応性は、濃縮ウイルス懸濁液をサンプルとしたWBで確認した。Vero E6細胞にSARS ウイルスHanoi株を感染させ48時間CO₂インキュベーターで培養した後、2000rpm、15分遠心し、ウイルス培養上清（TCID₅₀は7.95 x 10⁶ 6乗/ml）を調整した。培養上清は56℃、90分で不活性化処理を行なった後、31.5mlを日立超遠心機（40Tローター）を用いて、30Krpmで3時間遠心した。得られた沈殿にTNE（Tris-NaCl-EDTA）緩衝液（0.3ml）を加えピペッティングを行い濃縮ウイルス懸濁液を調製した。本懸濁液に等量の電気泳動用サンプル処理液を添加した後、過熱処理を行い分析用サンプルとした。12.5%ゲルにてSDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）を行った後、ニトロセルロース膜に転写しWB用転写膜を作製した。転写膜はスキムミルクでブロッキングした後、抗体との反応を行った。抗Nタンパク質モノクローナル抗体としてrSN-18抗体、rSN-122抗体、rSN-150抗体、rSN-29抗体、rSN-21-2抗体、rSN-122抗体を用い、無関係なモノクローナル抗体であるE2CT-38抗体を陰性

コントロールとして用いてWBを実施した。

抗体との反応は以下のとおりである。それぞれのモノクローナル抗体を抗原転写WB膜と室温、1時間振盪し反応を行った後、洗浄緩衝液（0.05% Tween20を含むPBS）で3回洗浄（5分の振盪洗浄）した。次にPOD標識抗マウスイムノグロブリン抗体（DACO社製）を加えさらに室温、1時間反応させた。洗浄緩衝液で4回洗浄（5分の振盪洗浄）後、基質4-クロロナフトール溶液を加えバンドの確認を行った。図3及び図4に示すように各モノクローナル抗体は分子量50Kd弱のNタンパク質に相当する位置にバンドが確認された。

【0056】

実施例3 サンドイッチELISA法によるウイルス培養上清中のNタンパク質の検出

リコンビナントNタンパク質及びウイルス培養上清をサンプルとしてサンドイッチELISAを行いNタンパク質測定系が成立するかどうかを確認した。ELISAは以下のように行った。すなわち、ファルコン社製ELISAプレートに各モノクローナル抗体を5 μ g/mlの濃度にPBS7.4で希釈し、1wellに50 μ lづつ入れ、4℃一晩放置しCoatした。次に1%BSA-PBS7.4を150 μ l/well入れ、37℃、1時間放置しMaskingを行った。洗浄緩衝液（0.05%Tween20含有PBS7.4）で3回洗浄後、リコンビナントNタンパク質及びウイルス培養上清を50 μ l/well入れ、37℃、1時間反応させた。リコンビナントNタンパク質は20ng/ml、培養上清はそのまま或いは洗浄緩衝液で希釈して用いた。このとき、対象としてウイルスで感染させていない細胞の培養上清を陰性コントロールとして用いた。次に、実施例1で記したハイブリドーマ培養上清から抗マウスイムノグロブリン抗体アフィニティーカラムで精製したモノクローナル抗体をプール後アルカリホスファターゼで標識した標識抗体を50 μ l/well入れ、37℃、1時間反応させた。洗浄緩衝液で3回洗浄後、基質p-ニトロフェニルホスフェート（p-NPP）を50 μ l/well入れ室温で15分放置後、目視と405nmの波長を測定した。表1に示すように、全てのモノクローナル抗体においてNタンパク質の検出が可能であることが確認された。

【0057】

【表1】

本発明 抗体	サンドイッチELISA 目視		サンドイッチELISA A405	
	ウイルス培 養上清	コントロー ル培養上清	ウイルス培 養上清*	リコンビナン トNタンパク
rSN-18	+	-	0.62	0.46
rSN-122	+	-	0.80	0.99
rSN-150	+	-	0.90	1.24
E2CT-38	-	-	0.05	0.10

*:4倍希釈で用いた

【0058】

参考例4 アルカリホスファターゼ標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体の作製

実施例1で作成した抗SARSウイルスモノクローナル抗体に2-イミノチオラン塩酸塩（アルドリッチ社製）を反応させ、チオール基を導入した。

次にマレイミド基を導入したアルカリホスファターゼと前記チオール基を導入した抗体とを反応させ、ゲルろ過処理を行い、精製アルカリホスファターゼ標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体を得た。

【0059】

実施例4 アルカリホスファターゼ標識抗SARSウイルスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法による測定

リコンビナントNタンパク質及び56℃、90分熱処理による不活化ウイルス培養上清を検体として以下に示すサンドイッチELISAを行った。

Nunc社製IMMUNOMODULE MAXISORPプレートに各モノクローナル抗体単独又は混合したものを10~15 μ g/mlの濃度にリン酸緩衝液7.5で希釈し、1wellに100 μ lずつ入れ、4℃一晩放置し固相化した。次に、洗浄緩衝液[0.02% TritonX-100含有TBS (Tris緩衝生理食塩水) pH7.2]で各Wellを3回洗浄後、1%BSA-リン酸緩衝液7.4を250 μ l/well入れ、37℃、一晩放置しブロッキングを行い抗体固相化プレートを作製した。抗体固相化プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄後、反応用液(1%BSA, 含有PBS, pH7.5)で希釈したリコンビナントNタンパク質(1.0ng/ml)及びウイルス培養上清(100 μ l/well)を入れ、室温(25℃)、1時間反応させた。このとき、対象としてウイルスで感染させていない細胞の培養上清を陰性コントロールとして用いた。洗浄緩衝液で4回洗浄後に、参考例4で作成した1.0~5.0 μ g/mlの標識抗体の単独又は混合したものを100 μ l/well入れ、室温(25℃)、1時間反応させた。洗浄緩衝液で4回洗浄後、基質p-ニトロフェニルホスフェート(p-NPP)を100 μ l/well入れ室温で30~60分放置後、波長405nmで測定した。リコンビナントNタンパク質及びウイルス培養上清について測定した吸光度測定の結果をそれぞれ表2aおよび表2bに示す。表2aに示すように、全てのモノクローナル抗体において組合せによる反応性は異なるが、リコンビナントNタンパク質の検出が可能であることが確認された。また、表2bに示すように、ウイルス培養上清に対してもリコンビナントNタンパク質に対する反応性とほぼ同じ反応性が認められた。

【0060】

【表2a】

表2a

標識抗体	固相化抗体				
	rSN-122	rSN-150	rSN-18	rSN-21-2	rSN-29
rSN-122	0.029	0.416	0.253	0.429	0.439
rSN-150	0.231	0.078	0.121	0.137	0.127
rSN-18	0.140	0.136	0.071	0.067	0.101
rSN-21-2	0.255	0.162	0.127	0.042	0.052
rSN-29	0.240	0.140	0.117	0.028	0.027

【0061】

【表2b】

表2b

標識抗体	固相化抗体				
	rSN-122	rSN-150	rSN-18	rSN-21-2	rSN-29
rSN-122	0.069	2.339	0.197	1.697	2.264
rSN-150	1.801	0.032	0.086	0.916	1.099
rSN-18	0.067	0.080	0.030	0.049	0.059
rSN-21-2	1.907	1.194	0.076	0.062	0.043
rSN-29	2.104	1.260	0.084	0.040	0.030

【0062】

実施例5 イムノクロマトグラフィーによる測定

リコンビナントNタンパク質及び56℃、90分熱処理による不活化ウイルス培養上清を検体としてイムノクロマトグラフィーによるNタンパク質の迅速検出を確認した。図4に示すイムノクロマトグラフィーの免疫測定器具1は以下のようにして作製した。

ニトロセルロース膜2(5mmx50mm)の一端に、20mg/mlの5-プロモ-4-クロロ-3

ーインドリル-リン酸ナトリウム (BCIP・Na) を基質として吸水性の不織布へ点着し、乾燥させた基質ゾーン7を有する展開液供給ゾーン3、他端に吸水性の吸収パッド (展開液吸収ゾーン5) を設けた。メンブレン部の標識試薬ゾーン4 (検体点着ゾーン8) の輸液方向の下流側に検出ゾーン6として、表3a又はbに記載のモノクローナル抗体 (1mg/ml) をライン点着し、乾燥して検出ゾーン6とした。次いでニトロセルロース膜をそのまま、又はBSAを含むPBSでブロッキングを行ったものに、吸水性不織布へ表3a又はbに示す単独又は2種類のアルカリホスファターゼ標識モノクローナル抗体 (35ng/パッド) を点着し、乾燥した標識試薬ゾーン4を付設した。

このようにして作製した免疫測定器具1について、3%BSA含有トリス緩衝生理食塩水 (検体処理液) でリコンビナントNタンパクおよび培養上清を希釈し、検体9 (25~30 μ l) を標識試薬ゾーン4上に設けた検体点着ゾーン8へ添加した後、展開液供給ゾーン3へ展開液10を300 μ lを滴下して検体および基質をニトロセルロース膜上に展開させ、15分後に検出ゾーン6でのラインの出現を確認した。その結果を表3aに示す。表3aに示すように、リコンビナントNタンパク質は、抗体の組合せにより反応性に差が見られるが、反応時間15分で検出が可能であった。一方、表2a,bおよび表3aの結果から、固相抗体と標識抗体の組合せで反応性が高い組合せを選択した系で、ウイルス培養上清の測定を行い、高希釈倍率でウイルス培養上清中のNタンパク質を検出できた。その結果を表3bに示す。

【0063】

【表3a】

表3a

固相抗体	標識抗体		
	rSN-150	rSN-122	rSN-18
rSN-150	—	4w	2
rSN-122	3	3w	4
rSN-18	2	4	—

表中の数値 (発色強度) は反応開始15分後の検出ラインの色の濃さを目視で判定
(4>4w>3>3w>2>2w>1, —: ライン未検出)

【0064】

【表 3 b】

表 3 b

標識抗体	固相抗体			
	rsN-150	rsN-122	rSN-21-2	rSN-29
rSN-122	1500	—	20000	15000
rSN-150	—	1500	1500	1500
rSN-21-2	1500	30000	—	—
rSN-29	3000	30000	—	—
rSN-122+rSN-150	1000	—	>3000	>3000
rSN-122+rSN-18	1000	—	>3000	>3000

数値は培養上清の検出可能な希釈倍率

—は未実施

>3000は3000倍以上を検出可能

【0065】

参考例 5 N5 ペプチドの合成と KLH コンジュゲートの作成

核タンパク質の配列表の配列番号 3 に記載された SARS 核タンパク質 244-260 (GQTVT KKSAAEASKKPRC) に相当するペプチドを島津製作所社製 (PSSM-8) のペプチド合成機で Fmoc 法により合成した。N5 ペプチドの合成方法は、合成機に記載の方法に従った。次いで、合成した前記ペプチドを常法に従ってキーホールリンペット・ヘモシアニン (KLH) と結合させ、KLH コンジュゲイトを作成した。

【0066】

実施例 6 N5 ペプチド抗原を用いた抗 N タンパク質モノクローナル抗体の確立

抗 N タンパク質に対するモノクローナル抗体は、参考例 5 で作製した N5 ペプチド KLH コンジュゲイトをマウスに免疫し、その脾臓リンパ球とミエローマ細胞を融合することにより作製した。製造法は、実施例 1 に記載された方法を繰り返すことにより実施し、スクリーニングして抗 N タンパク質モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ SN5-25 を確立した。このハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体を SN5-25 と命名した。

【0067】

実施例 7 アルカリホスファターゼ標識抗 SARS ウイルスモノクローナル抗体を用いた サンドイッチ ELISA 法による測定

参考例 4 に従い表 4 に示すアルカリホスファターゼ標識抗 SARS ウイルスモノクローナル抗体を作成した。更に、実施例 4 と同様に表 4 に示す抗体固相化プレートを作成し、ウイルス培養上清を用いて測定を実施した。その結果を表 4 に示す。SARS 核タンパク質 (244-260) に相当するペプチドを抗原とするモノクローナル抗体を用いた試薬であっても高希釈倍率でウイルス培養上清中の N タンパク質を検出できた。

【0068】

【表 4】

ウイルス培養上清測定結果

培養上清 (TCID ₅₀ /mL)	固相抗体	標識抗体	検出
3.55x10 ⁴	SN5-25	rSN-18	+
1.77x10 ⁴	SN5-25	rSN-18	+
1.22x10 ⁴	SN5-25	rSN-18	+
	rSN-150	rSN-122	+
8.11x10 ³	rSN-150	rSN-122	+

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図 1】 本発明で使用した発現用プラスミド pW6A の制限酵素地図を示す図である。

【図 2】 発現させた組換えタンパク質 (S-N) の測定結果を示す図である。

【図 3】 WB 法によるモノクローナル抗体 (rSN-18 抗体、rSN-122 抗体、rSN-150 抗体) の反応性を確認する測定図である。

【図 4】 WB 法によるモノクローナル抗体 (rSN-21-2 抗体、rSN-29 抗体、rSN-122 抗体) の反応性を確認する測定図である。

【図 5】 本発明のイムノクロマトグラフィーによる免疫測定器具 1 の断面図である。

【配列表フリーテキスト】

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fujirebio Inc.

<120> Anti SARS virus antibody

<130> P0840

<150> JP 2003/373779

<151> 2003-10-31

<150> JP 2003-373779

<151> 2003-10-31

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1269

<212> DNA

<213> Coronavirus

<400> 1
atgtctgata atggacccca atcaaacc aa cgtagtgccc cccgcattac atttggtgga 60
cccacagatt caactgacaa taaccagaat ggaggacgca atggggcaag gccaaaacag 120
cgccgacccc aaggtttacc caataatact gcgtcttggg tcacagctct cactcagcat 180
ggcaaggagg aacttagatt ccctcgaggc cagggcggtc caatcaacac caatagtggg 240
ccagatgacc aaattggcta ctaccgaaga gctacccgac gagttcgtgg tggtagcggc 300
aaaatgaaag agctcagccc cagatggtag ttctattacc taggaactgg ccagaagct 360
tcacttcctt acggcgctaa caaagaaggc atcgtagggg ttgcaactga gggagccttg 420
aatacaccca aagaccacat tggcaccgc aatcctaata acaatgctgc caccgtgcta 480
caacttcctc aaggaacaac attgccaaa ggcttctacg cagagggaag cagaggcggc 540
agtcaagcct ctctcgtc ctcatcacgt agtcgaggta attcaagaaa ttcaactcct 600
ggcagcagta ggggaaattc tctgctcga atggctagcg gaggtgggta aactgccctc 660
gcgctattgc tgctagacag attgaaccag cttgagagca aagtttctgg taaaggccaa 720
caacaacaag gccaaactgt cactaagaaa tctgctgctg aggcattctaa aaagcctcgc 780

caaaaacgta ctgccacaaa acagtacaac gtcactcaag catttgggag acgtggtcca 840
 gaacaaaccc aaggaaattt cggggaccaa gacctaata gacaaggaac tgattacaaa 900
 cattggccgc aaattgcaca atttgctcca agtgcctctg cattctttgg aatgtcacgc 960
 attggcatgg aagtcacacc ttcgggaaca tggctgactt atcatggagc cattaatg 1020
 gatgacaaag atccacaatt caaagacaac gtcatactgc tgaacaagca cattgacgca 1080
 tacaaaacat tcccaccaac agagcctaaa aaggacaaaa agaaaaagac tgatgaagct 1140
 cagcctttgc cgcagagaca aaagaagcag cccactgtga ctcttcttcc tgcggctgac 1200
 atggatgatt tctccagaca atttcaaat tccatgagtg gagcttctgc tgattcaact 1260
 caggcataa 1269

<210> 2
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Coronavirus

<400> 2

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile
 1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly
 20 25 30

Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn
 35 40 45

Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu
 50 55 60

Leu Arg Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Gly
 65 70 75 80

Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Val Arg
 85 90 95

Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Glu Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr
100 105 110

Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys
115 120 125

Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys
130 135 140

Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu
145 150 155 160

Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly
165 170 175

Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg
180 185 190

Gly Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro
195 200 205

Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu
210 215 220

Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Val Ser Gly Lys Gly Gln
225 230 235 240

Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser
245 250 255

Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Gln Tyr Asn Val Thr
260 265 270

Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly
275 280 285

Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln

290

295

300

Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg
 305 310 315 320

Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr His Gly
 325 330 335

Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn Val Ile
 340 345 350

Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu
 355 360 365

Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro Leu Pro
 370 375 380

Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp
 385 390 395 400

Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly Ala Ser
 405 410 415

Ala Asp Ser Thr Gln Ala
 420

<210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Coronavirus

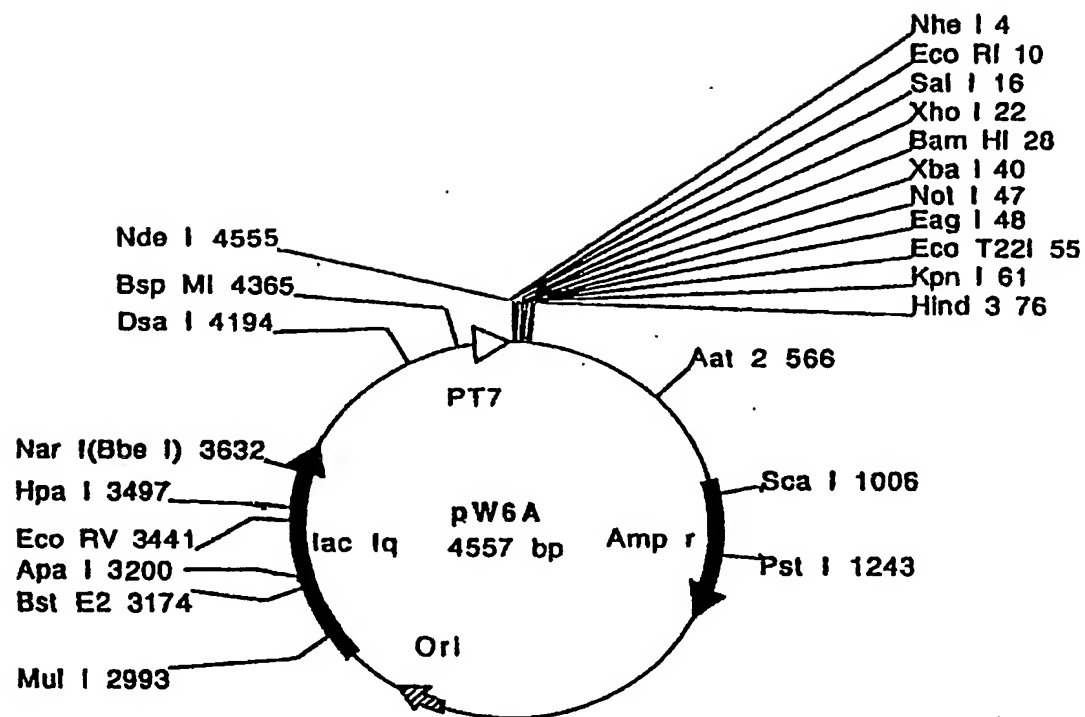
<400> 3

Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys Pro
 1 5 10 15

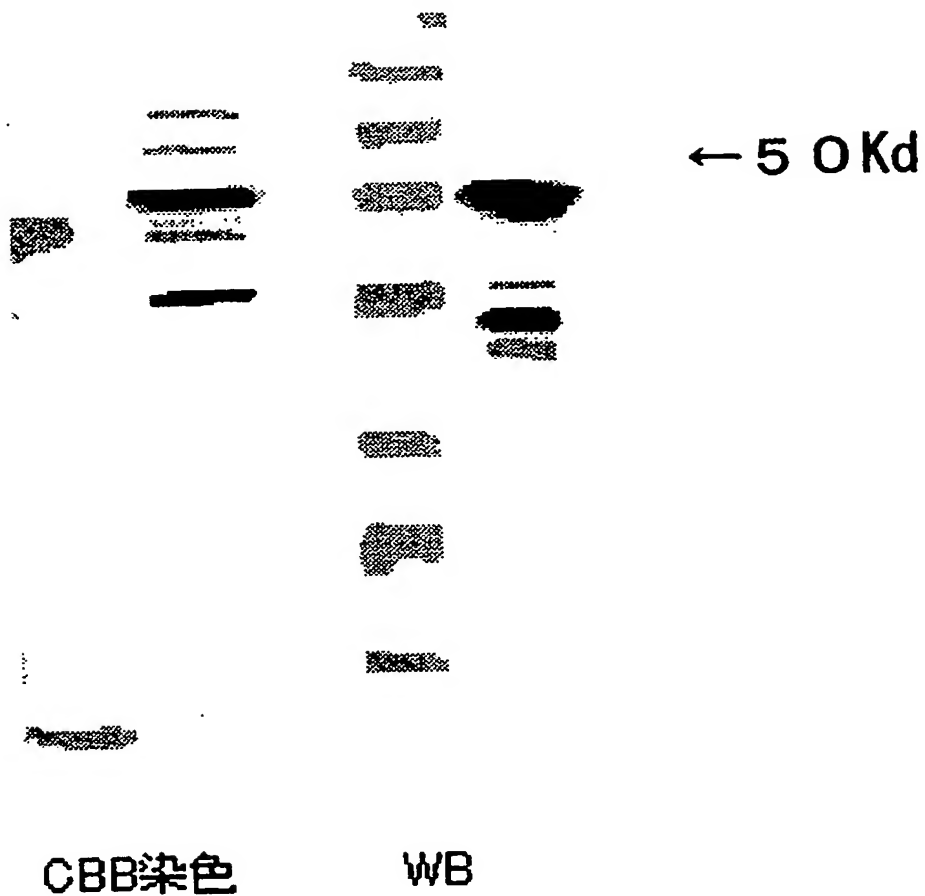
Arg Cys

【書類名】 図面

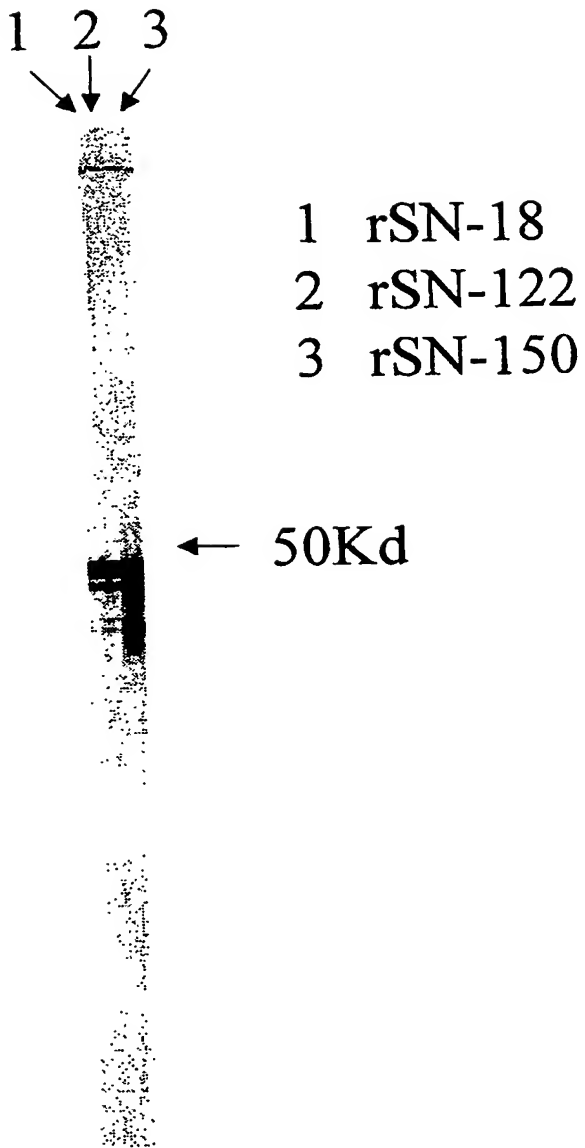
【図1】



【図2】



【図 3】



【図 4】

ウイルス抗
原転写膜

組換え抗原
転写膜



← 50K

← 37K

1 : rSN-29

2 : rSN-21-2

3 : rSN-122

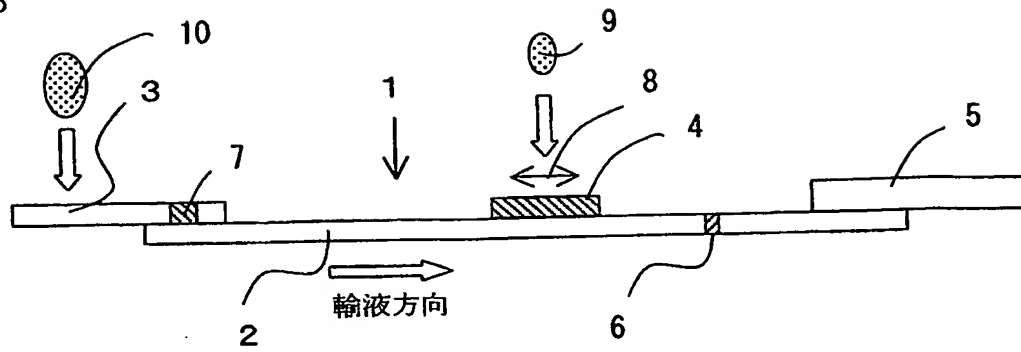
4 : E2CT-38

2 1

4 3 2 1

【図 5】

図 5



【書類名】 要約書

【要約】

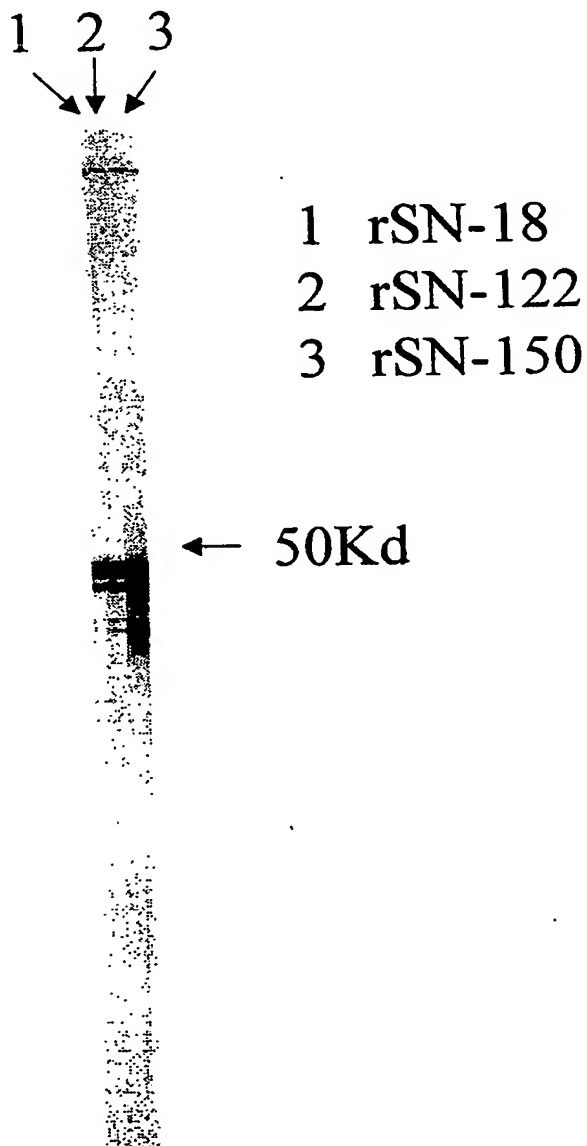
【課題】

重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome ; S A R S) 原因コロナウイルスの核タンパク質に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び、前記モノクローナル抗体を固相抗体及び標識抗体の少なくとも一方に用いる S A R S ウイルスの免疫測定試薬を提供する。

【解決手段】

配列表 1 で表される塩基配列を組み込んだベクターから発現された前記コロナウイルスの核タンパク質を免疫原として使用し得られる S A R S ウイルスの核タンパク質と反応するモノクローナル抗体を作成する。

【選択図】 図 3



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-034268
受付番号	50400219873
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 2月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 2月10日
【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000237204
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
【氏名又は名称】	富士レビオ株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 3 4 2 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 3 7 2 0 4]

1. 変更年月日 1 9 9 7 年 5 月 1 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号

氏 名

富士レビオ株式会社